

**Process for preparing photoactivated (-) yellow skin amide**

**Patent number:** CN1345721  
**Publication date:** 2002-04-24  
**Inventor:** HUANG LIANG (CN); ZHANG JUNTIAN (CN); WU KEMEI (CN)  
**Applicant:** PHARMACEUTICAL INST CHINESE AC (CN)  
**Classification:**  
**- international:** **A61K31/40; A61P43/00; C07D207/273; C12P17/10;**  
**A61K31/40; A61P43/00; C07D207/00; C12P17/10;**  
(IPC1-7): C07D207/273; A61K31/40; A61P43/00;  
C12P17/10  
**- european:**  
**Application number:** CN20000124630 20000928  
**Priority number(s):** CN20000124630 20000928

**Also published as:**

CN1160331C (C)

**Report a data error here****Abstract of CN1345721**

The preparation method of photoactive (-) yellow-skin acidamide or its derivative includes the following steps: using chloracetyl chloride and chiral alcohol R\*OH to form chloroacetate of chiral alcohol, making it react with benzalhyde to obtain photoactive aryl glycidic acid chiral alcohol ester, making it undergo the process of ester exchange reaction to obtain correspondent phenyl glycidic methyl ester, and then making it correspondent amine undergo the processes of condensation and oxidation to obtain (+)-(2S,3R)-N-methyl-N-phenacyl-3-phenyl glycidic amide, under the alkaline condition making cyclopolymerization to obtain photoactive (-) yellow-skin amino ketone, through the reductino treatment by using sodium borohydride so as to obtain the photoactive (-) yellow-skin acidamide or its derivative which can be used for preparing medicine with the functions of promoting intelligence development and resisting senility.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>

C07D207/273

C12P 17/10 A61K 31/40

A61P 43/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00124630.5

[43] 公开日 2002 年 4 月 24 日

[11] 公开号 CN 1345721A

[22] 申请日 2000.9.28 [21] 申请号 00124630.5

[71] 申请人 中国医学科学院药物研究所

地址 北京市先农坛街一号

[72] 发明人 黄 量 张均田 吴克美 孙万儒

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 沙 捷

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 光活(-)黄皮酰胺制备方法

[57] 摘要

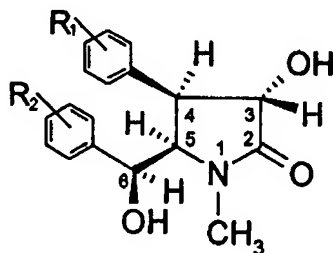
一种制备光活(-)黄皮酰胺或其衍生物的方法,以氯乙酰氯与手性醇 R\*OH 形成手性醇的氯乙酸酯;再与苯甲醛反应得光活的芳基缩甘油酸手性醇酯;经酯交换得相应的苯基缩水甘油酸甲酯;与相应的胺缩合和氧化得(+)-(2S,3R)-N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺;在碱性条件下环合,得光活(-)黄皮酰胺酮,再经硼氢化钠还原可得光活(-)黄皮酰胺或其衍生物。及其在制备促智,抗衰老作用药物的应用。

ISSN 1008-4274

# 权 利 要 求 书

1 一种制备具有如通式 I 所示的光活化合物 (一) 黄皮酰胺或其衍生物的方法,

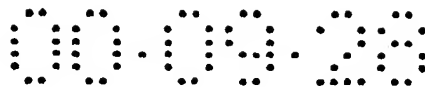
通式 (I) 所示的结构, 其绝对构型为 (3S, 4R, 5R, 6S), 具有左旋光性, 其中  $R_1$  及  $R_2$  可以是 H、卤素、 $C_{1-6}$  的烷基、



I

烷氧基、次甲二氧基、硝基; 也可以是多取代;  $R_1$  和  $R_2$  可以相同, 也可以不同。  $R_1, R_2 = H$  时, 为 (-) 黄皮酰胺, 包括以下步骤:

- (1) 以氯乙酰氯与手性醇  $R^*OH$  形成手性醇的氯乙酸酯 (1)\*;
  - (2) 得到的手性醇的氯乙酸酯与苯甲醛或  $R_1$  取代的苯甲醛反应, 获得相应光活的芳基缩水甘油酸手性醇酯 (2a)\*、(2b)\*;
  - (3) 经酯交换得 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯 (2)\*,
  - (4) 得到的 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯 (2)\* 与相应的胺缩合得 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-( $\beta$ -羟基-苯乙基)-3-苯基缩水甘油酰胺 (3)\*, 再经氧化得 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺 (4)\*;
  - (5) 所述的 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺 (4)\* 在碱性条件下环合得光活 (-) 黄皮酰胺酮 (5)\*
  - (6) 光活黄皮酰胺酮 (5)\* 经硼氢化钠还原可得光活黄皮酰胺或其衍生物。
- 2 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述的 所述的手性醇包括 (+) 薄荷醇、(+)-8 苯基薄荷醇或者 (+)-8  $\beta$  萘基薄荷醇。
- 3 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于环合所用的碱包括氢氧化锂、氢氧化



- 钠、氢氧化钾、二异丙胺基锂，丁基锂，四烷基氢氧化胺及三烷基胺。
- 4 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于环合时使用的溶剂为水、甲醇、乙醇等低烷基醇或它们的混合物。
- 5 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于可以利用消旋黄皮酰胺酮化合物(5)的 C<sub>3</sub> 位的羟基与拆分剂手性酸成酯，然后经重结晶或层析分离所得一对差向异构体，所述的拆分剂手性酸包括：L 孟氧乙酸，樟脑磺酸、(-) S 邻苯二甲酰丙氨酸或者 N-对甲苯磺酰脯氨酸，优选的是(-) S 邻苯二甲酰丙氨酸。
- 6 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于可以将消旋的 3-苯基缩水甘油酸甲酯经酶拆分的方法制得 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*，其中，采用具有产生水解酶能力的选自真菌，细菌，酵母，和放线菌的微生物在培养基中，温度为 10-50℃，优选为 20-40℃ 下有氧发酵对化合物 (+) β-苯基缩水甘油酸甲酯进行立体选择性水解反应，其水解反应的 pH 值介于 5-10 之间，温度为 10-50℃，分离萃取得到光活性黄皮酰胺。
- 7 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于所述的具有产生水解酶的能力的微生物包括无色杆菌 (*Achromobacter. sp*)，产碱杆菌 (*Alcaligenes. sp*)，节杆菌 (*Archrobacter, sp*)，芽孢杆菌 (*Bacillus sp*)，短杆菌 (*Breubacillus, sp*)，棒杆菌 (*Corynebacterium, sp*)，欧文氏菌 (*Erwinia sp*)，假单孢菌 (*Pseudomonas sp*) 属，酵母的假丝酵母 (*Candida sp*) 和毕赤 (*Pichia sp*)，红酵母 (*Rhadatorula sp*)，汉荪酵母 (*Hansenula sp*) 属，真菌中的曲霉 (*Aspergillus*)，毛霉 (*Mucor sp*)，米曲霉 (*Aspergillus, sp*)，青霉 (*Penicillium*)，根霉 (*Rhizopus sp*) 以及放线菌中的诺卡氏 (*Nocardia sp*)，链霉菌 (*Streptomyces sp*)。
- 8 如权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于所述的立体选择性水解反应中，底物的浓度可以控制在 0.05-10% 之间，最好为 0.5-5%，pH 为 5-11，最好为 6-9。
- 9 如权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于可以在培养基中加入表面活性剂，以增大底物在缓冲溶液中的溶解度，表面活性剂包括聚乙二醇、吐温、聚乙烯醇、十六烷基三甲基溴化铵，表面活性剂的浓度控制在 0.05-5%，优选为 0.5-2%。
- 10 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于所述的立体选择性水解反应可以在缓冲液和有机溶剂中两相中进行，所述的有机溶剂包括：苯、甲苯、二甲苯、乙醚、

乙酸乙酯、异丙醚、四氯化碳、氯仿，优选是甲苯或二甲苯或异丙醚。

11 如权利要求 10 所述的方法，其特征在所述的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液、邻苯二甲酸缓冲液、酒石酸缓冲液、二乙基巴比妥酸钠缓冲液、2,4,6-三甲基吡啶-盐酸缓冲液、2-氨基-2-羟甲基-(1,3)丙二醇-盐酸缓冲液，柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 N-乙基吗啉-盐酸缓冲液。

12 如权利要求 1 所述的光学活性化合物（一）黄皮酰胺在制备促智，抗衰老作用药物的应用。



## 说 明 书

### 光活（一）黄皮酰胺制备方法

本发明涉及一种光活黄皮酰胺制备方法以及光活黄皮酰胺用于治疗老年痴呆的潜在性药物用途。

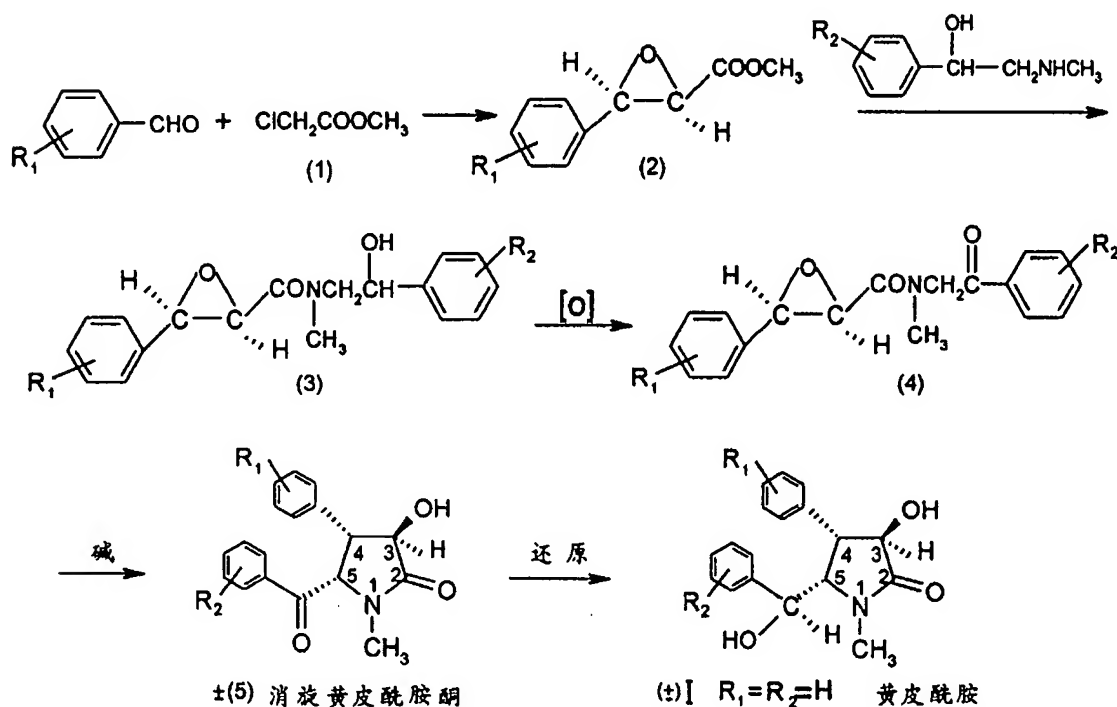
目前我国人口的平均寿命已超过 70 岁，比解放时的人均寿命增加了一倍。国外一项科学研究预测：到 2025 年时，15 岁以下儿童的比例将占总人口的 18.6%，而 65 岁及 65 岁以上的老年人将超过童数，达到 18.8%，这个数字表明，再过 20 余年，每 5 个人中就有 1 个老年人。早老性痴呆症 (Alzheimer's Disease) 多发生在 50 余岁。因脑血管病变引发的多发性栓塞性痴呆或老年性痴呆多发生在 60 岁以后。可见，由于人口的老龄化，早老性痴呆症和老年性痴呆症的发病率也必将增加。老年人及其特有的神经退化性疾病——各种痴呆症要经历两种死亡，首先是精神上的死亡，后是肉体上的死亡，苦不堪言，更给社会和家庭带来沉重负担。人口老龄化被认为是仅次于战争，瘟疫，饥荒，资源能源短缺而影响社会发展和安定的不利因素。

防治衰老和治疗老年痴呆的药物种类繁多，如脑血管扩张药，通过改善脑血流量有助于提供能量和改善智能，但真正有价值的脑血管扩张药必须具有高度选择性，不影响脑代谢，无“窃血”现象，有抗血小板聚集和抗血栓作用。钙拮抗剂尼莫地平虽符合上述某些条件，但它仅作用于电压依赖性钙通道中的 L 通道，对 N 型和 T 型钙通道无影响。增强胆碱系统功能的药物中，Ach 前体仅有微弱的治疗作用，Ach 受体激动剂和胆碱脂酶抑制剂虽有一定效果，但作用较短暂，毒副作用较大。多种神经肽和神经生长因子曾被认为有治疗痴呆症的希望，但临床效果不佳，可能主要归因于这类物质难以通过血脑屏障进入脑内发挥作用，2 吡咯烷酮乙酰胺 (piracetam 国内已生产，商品名脑复康) 问世后，在早期文献中属没有争论的一类新型促智药 (nootropil, 该词是从希腊词 *noo* (脑) 和 *tropein* (向) 衍化而来)，近几年来国内外报道，该药对各类型的记忆障碍和老年痴呆作用轻微或尚无定论，一个主要原因是该药为水溶性化合物，通过血脑屏障率低，不易集中到靶点发挥作用。

本申请人从芸香科植物黄皮 [*Clausena Lansium* (Lour.) Skells] 中第一次分离出含有脑复康药的  $\gamma$  内酰胺骨架的化合物，称之为黄皮酰胺 (Clausenamide)。

黄皮酰胺是具有四个手性中心的  $\gamma$  内酰胺，天然品为消旋体，消旋黄皮酰胺的合成方法曾申请欧洲专利，其申请号为 EP0414020。中国专利申请 86107090，90107145.5 和 90107144.7。

现有技术中，消旋(±)黄皮酰胺的制备路线和方法如下：



但是，这种方法不能直接用于制备本发明所述的具有光学活性的黄皮酰胺或其衍生物。

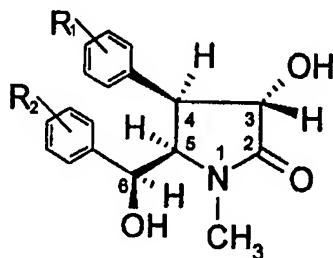
为了克服现有技术的不足之处，本发明的目的在于提供一种光学活性黄皮酰胺或其衍生物；

本发明的另一目的目的在于提供一种光学活性黄皮酰胺的制备方法；

本发明的另一目的在于提供一种该光学活性化合物(一)黄皮酰胺在制备促智，抗衰老作用药物的应用。

现对(-)、(+)黄皮酰胺的制备方法，促智，抗衰老作用及其可能的作用机制报道于后。

本发明所述的化合物具有如下通式(I)所示的结构, 其绝对构型为 (3S,4R,5R,6S), 具有左旋光性, 其中  $R_1$  及  $R_2$  可以是 H、卤素、 $C_{1-6}$  的烷基、



I

烷氧基、次甲二氧基、硝基; 也可以是多取代;  $R_1$  和  $R_2$  可以相同, 也可以不同。  $R_1, R_2=H$  时, 为(-) 黄皮酰胺, 另外, 本发明也包括制备过程中的产生的光活中间体。

本文中\*表示为光活物质。

本发明还涉及一种制备具有如通式 I 所示的光活化合物的方法, 它是一种不对称从头 (de novo) 合成法, 该本合成法采用分子内诱导不对称 Darzen's 反应, 以光活  $R^*$  为配体。它包括以下步骤:

(1) 以氯乙酰氯与手性醇  $R^*OH$  形成手性醇的氯乙酸酯(1)\*;

所述的手性醇包括 (+) 薄荷醇、(+)-8 苯基薄荷醇或者 (+)-8  $\beta$  萘基薄荷醇。

(2) 得到的手性醇的氯乙酸酯与苯甲醛或  $R_1$  取代的苯甲醛反应, 获得相应光活的芳基缩水甘油酸手性醇酯(2a)\*、(2b)\*;

(3) 经酯交换得 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*,

(4) 得到的 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\* 与相应的胺缩合得 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-( $\beta$ -羟基-苯乙基)-3-苯基缩水甘油酰胺(3)\*, 再经氧化得 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺(4)\*;

(5) 所述的 (+) - (2S, 3R) - N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺(4)\* 在碱性条件下环合得光活 (-) 黄皮酰胺酮(5)\*

所述的碱包括氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、二异丙胺基锂, 丁



基锂，四烷基氢氧化胺及三烷基胺。

环合时使用的溶剂为水、甲醇、乙醇等低烷基醇或它们的混合物，如甲醇和水等。

(6) 光活黄皮酰胺酮(5)\*经硼氢化钠还原可得光活黄皮酰胺或其衍生物。

应当指出的是在上述的方法中，所述的手性醇包括(+)薄荷醇、(+)-8-苯基薄荷醇或者(+)-8-萘基薄荷醇。环合步骤所用的碱包括氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、二异丙胺基锂，丁基锂，四烷基氢氧化胺及三烷基胺。环合时使用的溶剂为水、甲醇、乙醇等低烷基醇或它们的混合物。

本发明的光活黄皮酰胺或其衍生物还可以经另一步骤制得。换言之，本发明的光活的黄皮酰胺及其衍生物可通过中间体拆分法获得。

#### 1. 化学拆分方法

在本发明的方法中，可以利用消旋黄皮酰胺酮化合物(5)的C<sub>3</sub>位的羟基与拆分剂手性酸成酯，然后经重结晶或层析分离所得一对差向异构体。

该拆分剂手性酸包括：L-孟氧乙酸，樟脑磺酸、(-)-S-邻苯二甲酰丙氨酸或者N-对甲苯磺酰脯氨酸，优选的是(-)-S-邻苯二甲酰丙氨酸。

该方法包括以下步骤：利用中间体消旋黄皮酰胺酮化合物(5)的C<sub>3</sub>位的羟基与手性酸成酯，然后经重结晶或层析分离得一对差向异构体。

具体地讲，是将(-)-S-邻苯二甲酰丙氨酸，在SOCl<sub>2</sub>的存在下，在甲苯中与消旋黄皮酰胺酮反应，得到(-)-(3S, 4R, 5R)-5-苯甲酰基-1-甲基-4-苯基-3-[(S)-α-(邻苯二甲酰亚胺基)丙酰氧基]吡咯烷-2-酮和(+)-(3S, 4R, 5R)-5-苯甲酰基-1-甲基-4-苯基-3-[(S)-α-(邻苯二甲酰亚胺基)丙酰氧基]吡咯烷-2-酮。经重结晶得旋光为(-)的差向异构体，后者在NaBH<sub>4</sub>和NaOH的存在下水解，经减压浓缩，重结晶得到本发明的(-)黄皮酰胺。

另外，将消旋黄皮酰胺酮投入(-)-孟氧乙酰氯的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液中，室温反应，反应物经重结晶，得(-)-(3S, 4R, 5R)-5-苯甲酰基-3-孟氧乙酰氧基-1-甲基-4-苯基吡咯烷-2-酮。后者以对甲苯磺酸水解，得光活(-)黄皮酰胺酮，然后，按照上述步骤(b)经NaBH<sub>4</sub>还原，制得(-)黄皮酰胺。

2 酶拆分方法：可以利用酶对对映异构体的不同反应速度，可以将消旋的 3-苯基缩水甘油酸甲酯经酶拆分的方法制得 (+) - (2S, 3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*, 其中,

采用具有产生水解酶能力的选自真菌, 细菌, 酵母, 和放线菌的微生物在培养基中, pH 为 5-8, 温度为 10-50℃, 优选为 20-40℃ 下有氧发酵, 所产生的菌丝对化合物 (+)  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯进行立体选择性水解反应, 其水解反应的 pH 值介于 5-10 之间, 温度为 10-50℃, 分离萃取得到光活性黄皮酰胺。

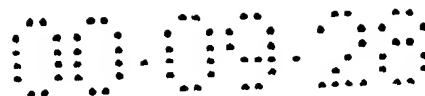
在本发明之酶拆分方法中使用的, 具有产生水解酶的能力的微生物可以是真菌, 细菌, 酵母, 和放线菌。这些细菌包括如无色杆菌 (*Achromobacter. sp*), 产碱杆菌 (*Alcaligenes. sp*), 节杆菌 (*Archrobacter, sp*), 芽孢杆菌 (*Bacillus sp*), 短杆菌 (*Breubacillus, sp*), 棒杆菌 (*Corynebacterium, sp*), 欧文氏菌 (*Erwinia sp*), 假单孢菌 (*Pseudomonas sp*) 属, 酵母的假丝酵母 (*Candida sp*) 和毕赤 (*Pichia sp*), 红酵母 (*Rhadatorula sp*), 汉荪酵母 (*Hansenula sp*) 属, 真菌中的曲霉 (*Aspergillus*), 毛霉 (*Mucor sp*), 米曲霉 (*Aspergillus, sp*), 青霉 (*Penicillium*), 根霉 (*Rhizopus sp*) 以及放线菌中的诺卡氏 (*Nocardia sp*), 链霉菌 (*Streptomyces sp*) 等菌株均有这种产酶能力。这些菌种很容易从市场上得到。

在培养基中也可以加入表面活性剂, 以增大底物在缓冲溶液中的溶解度, 表面活性剂包括聚乙二醇、吐温、聚乙烯醇、十六烷基三甲基溴化铵, 表面活性剂的浓度控制在 0.05~5%, 优选为 0.5~2%。

在上述的立体选择性水解反应中, 底物的浓度可以控制在 0.05~10% 之间, 最好为 0.5~5%, pH 为 5~11, 最好为 6~9。

所述的立体选择性水解反应可以在缓冲液和有机溶剂中两相中进行, 所述的有机溶剂包括: 苯、甲苯、二甲苯、乙醚、乙酸乙酯、异丙醚、四氯化碳、氯仿, 优选是甲苯或二甲苯或异丙醚。

所述的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液、邻苯二甲酸缓冲液、酒石酸缓冲液、二乙基巴比妥酸钠缓冲液、2,4,6-三甲基吡啶一盐酸缓冲液、2-氨基-2-羟甲基-(1, 3) 丙二醇一盐酸缓冲液, 柠檬酸一磷酸氢二钠缓冲液和 N-乙基吗啉一盐酸缓冲液。



换言之，培养上述微生物，可产生上述水解酶，发酵产生的细胞均可用作酶源。使用本领域技术人员熟知的包括碳源，氮源的培养基和适当的诱导物和常用的无机盐。发酵在加热或常温，优选在 20~40℃ 下，有氧的情况下进行，pH 值介于 5~8 之间。

立体选择性的水解反应可在适当的溶剂中进行。所述的有机溶剂包括：苯、甲苯、二甲苯、乙醚、乙酸乙酯、异丙醚、四氯化碳、氯仿，优选是甲苯或二甲苯或异丙醚。

底物的浓度可控制在 0.05~10% 之间，优选在 0.5~5% 之间。反应可在室温或在加热的情况下进行，加热温度优选在 10~50℃ 之间，反应液的 pH 值对水解反应也有很大的影响，因此反应过程中要调节 pH 值并控制在 5~10 之间，优选在 6~9 之间。

外消旋  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯的酶促水解反应可在缓冲溶液中进行，也可在缓冲溶液和如甲苯、苯、乙醚、乙酸乙酯、异丙醚，二甲苯，四氯化碳，氯仿等两相有机溶剂中进行，优选的有机溶剂为甲苯，二甲苯，异丙醚。

将光学活性  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯从反应体系中的分离纯化可按本领域技术人员熟知的常规方法进行。

由于反应过程中有苯乙醛生成，因此产物须用饱和亚硫酸氢钠的水溶液进行洗涤。

如果反应是在水相和有机相两相间进行，则将有机相分离出来，水层以有机溶剂萃取，合并有机层，并以饱和的亚硫酸氢钠水溶液洗涤，干燥，浓缩。若反应是在水相中进行，则以有机溶剂萃取，并以饱和的亚硫酸氢钠水溶液洗涤，干燥，浓缩。

因此，按照上述酶拆分方法可以得到 (+)  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯 (2)\*，可作为合成 (-) 黄皮酰胺的关键中间体。

经本发明方法得到的 (-) 黄皮酰胺对正常鼠或记忆障碍鼠的记忆改善作用所需口服剂量为  $5\sim 10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，而 (+) 黄皮酰胺无效。现有技术中，曾对 (±)、(+)、(-) 黄皮酰胺的易化学习、记忆及加强突触长时程增强 (LTP) 的作用及其与脑复康 (Piracetam) 的比较进行了详细研究。

脑复康的口服有效剂量为  $500\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，(Dall R. Demographic and epidemiological trends today. In: Wolff HP et al eds. Drug research and drug

development in 21<sup>st</sup> century. Berlin:Spring-verlag. 1998:25-26.), 故(-)黄皮酰胺改善记忆作用的强度是脑复康的 50~100 倍, (-)黄皮酰胺也能增强突触基础传递和加强高频电刺激引起的 LTP 的幅度, (+)黄皮酰胺和脑复康对 LTP 无影响。

本发明化合物可用口服方法或非肠胃道用药。口服用药可以是片剂、胶囊剂、包衣剂, 非经肠用药剂型有注射剂和栓剂等。这些制剂是按照本领域的技术人员所熟知的方法制备的。为制造片剂、胶囊剂、包衣剂所用的辅料是常规用的助剂, 例如淀粉, 明胶, 阿拉伯胶, 硅石, 聚乙二醇, 液体剂型所用的溶剂例如有水, 乙醇, 丙二醇, 植物油类如玉米油, 花生油, 橄榄油等。含有本发明化合物的制剂中还可有其他助剂, 例如表面活性剂, 润滑剂, 崩解剂, 防腐剂, 矫味剂, 色素等。

在片剂、胶囊剂、包衣剂, 注射剂或栓剂中含有本发明通式 (I) 化合物的剂量是以单元剂型中存在的化合物量计算的。

在上述工作基础上, 本发明人取得了新的进展, 基本阐明了(-)黄皮酰胺易化学习记忆和 LTP 的作用机制, 观察到(-)黄皮酰胺对  $\beta$ -amyloid( $\beta$ -A)致记忆障碍的改善作用和抗神经细胞凋亡作用。

附图简要说明:

图 1 是本发明方法的化学合成路线图, 其中,

(+) 2 表示: (+) - (2S,3R) - 3-苯基缩水甘油酸甲酯;

(+) 3 表示: (+) - (2S,3R) - N-甲基-N-( $\beta$ -羟基-苯乙基)-3-苯基缩水甘油酰胺;

(+) 4 表示: (+) - (2S,3R) - N-甲基-N-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺;

(-) 5 表示: (-) 黄皮酰胺酮;

(-) - (3S, 4R, 5R) - 3-羟基-5-苯甲酰甲基-1-甲基-4-苯基吡咯烷-2-酮;

(-) I 表示: (-) 黄皮酰胺;

(-) - (3S, 4R, 5R, 6S) - 3-羟基-5-( $\alpha$ -羟基苄基)-1-甲基-4-苯基吡咯烷-2-酮。

图 2 为四种典型的搜寻策略在 Morris 水迷宫训练中出现频率的动态变化图。

其中 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7 分别代表对照组、模型组、模型加 (-) 黄皮酰胺 8mg/kg 治疗组、模型 (-) 黄皮酰胺 40mg/kg 治疗组、模型 (+) 黄皮酰胺 8mg/kg 治疗组、模型 (+) 黄皮酰胺 40mg/kg 治疗组、模型加脑复康 400mg/kg 治疗组。

图 3 为大鼠齿状回苔状神经纤维发芽的区分布图, 其中

A 对照, B (-) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , C (-) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , D (+) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , E (+) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  与对照组比较,  $*P < 0.05$  及  $**P < 0.01$ 。

图 4 为大鼠海马 CA3 区苔状神经纤维发芽的区分布图, 其中,

A 对照, B (-) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , C (-) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , D (+) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , E (+) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  与对照组比较,  $*P < 0.05$   $**P < 0.01$ 。

图 5 为 BDNF 蛋白在海马锥体细胞和皮层细胞内表达的相对量的分布图, 其中, A 对照, B (-) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , C (-) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , D (+) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , E (+) 黄皮酰胺  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

图中\*及\*\*表示与对照组比较,  $P < 0.05$  及  $**P < 0.01$ 。

本文以下使用的字“孟”应为具有草字头的“孟”。

以下将结合实施例详细描述本发明, 但是非限定的目的。

#### 实施例 1 (+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸(+)-8-β-萘取代孟醇酯(2a)\*:

将 NaH (80%) 430mg 加入 20ml 干燥的 THF 中,  $\text{N}_2$  保护下磁力搅拌, 缓慢滴加 1g 苯甲醛和 2.3g (+)-8-β-萘基孟醇氯乙酸酯(1a)\*的 10ml THF 溶液, 加毕, 室温搅拌 40 小时, 将反应液倾入 30ml 的冰水中 (含 1ml 冰乙酸), 用乙醚 (40ml×3) 萃取, 依次用饱和的  $\text{NaHSO}_3$  水溶液, 饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液, 饱和 NaCl 水溶液洗涤, 加无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 减压浓缩至干, 得 2.9g 油状物., 经硅胶柱层析得 2.16g 白色固体。

收率 79.0%, mp:  $38\sim 40^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{15} = +35.8^\circ$  (C 1.31  $\text{CHCl}_3$ )。NMR 500MHz,  $\delta$ , ppm: 7.03-6.4 (12H,m), 4.96(1H,td,  $J=2.2\text{Hz}$ , 10.7Hz), 3.96 (1H, d,  $J=1.27\text{Hz}$ ), 2.64 (1H,d, $J=1.2\text{Hz}$ ), 1.48 (3H,s), 0.98 (3H, d,  $J=6.48\text{Hz}$ ), 0.9-2.2(9H,m)

#### 实施例 2. (+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸(+)-孟醇酯(2b)\*

将 NaH (80%) 3.27g 加入 100ml 无水 THF 中搅匀, 滴加 11.6g 苯甲醛和 11.85g 氯乙酸(+) 孟醇酯(1b)\* 的 100ml 无水 THF 溶液, 加毕, 室温搅拌 10 小时, 抽滤, 滤液减压浓缩至干, 加入适量乙醚溶解, 依次用饱和 NaHSO<sub>3</sub> 水溶液, 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液, 饱和 NaCl 水溶液洗至中性, 加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 所得油状物冷冻固化, 重结晶三次, 得白色结晶 7.62g。收率 35%, mp: 62~63°C,  $[\alpha]_D^{15} = +167^\circ$  (C 1.0 CHCl<sub>3</sub>)。

### 实施例 3 (+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*

将 4.28g 化合物(2a\* 或 2b\*) 溶于 80ml 甲醇, 磁力搅拌, 加入 200mg 甲醇钠, 反应 6 小时后, 滴加 0.2ml 冰乙酸, 减压浓缩干, 加入 100ml 乙醚搅拌 30 分钟过滤, 减压浓缩至干, 得 4.3g 油状物, 经硅胶柱层析, 得 1.33g 油状化合物(2)\*。收率: 75%,  $[\alpha]_D^{15} = +170.9^\circ$  (C 1.33 CHCl<sub>3</sub>)。

### 实施例 4 (+)-2S,3R-N-甲基-N-(β-羟基苯乙基)-3-苯基缩水甘油酰胺(3)\*

将 1.78g 化合物(2)\*, 1.51g N-甲基-β-羟基苯乙胺分别溶于 5ml 甲醇中, 冷却至-20°C 后混合, 加入 100mg 甲醇钠, 溶解后冰箱中放置 2 天; 滴加 0.2ml 2N 盐酸, 减压浓缩干, 得白色固体, 过滤得 2.3g 化合物(3)\*。收率: 77.3%, mp: 93~94°C,  $[\alpha]_D^{15} = +70.2^\circ$  (C 0.684 CH<sub>3</sub>OH)。

### 实施例 5 (+)-2S,3R-N-甲基-N-α-苯甲酰甲基-3-苯基缩水甘油酰胺(4)\*

将 2.97g 化合物(3)\*, 2.2g 无水 CuSO<sub>4</sub> 和 6.32g KMnO<sub>4</sub> 依次加入到 100ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中搅拌 3 小时, 过滤、用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 洗、减压浓缩干, 得 2.9g 油状物, 重结晶, 得 2.3g 化合物(4)\*。收率: 78.0%, mp: 86~87°C,  $[\alpha]_D^{15} = +140.2^\circ$  (C 0.5 CH<sub>3</sub>OH)。

### 实施例 6 (-)-黄皮酰胺酮的合成(5)\*

将 2.95g 化合物(4)\* 粉末加入到 6.6mg LiOH·H<sub>2</sub>O 的 30ml 水溶液中, 于 30~35°C 水浴中磁力搅拌 8 小时, 冷却、过滤、干燥, 重结晶, 得 1.5g 化合物(5)\*。

收率: 50.8%, mp: 196~198°C,  $[\alpha]_D^{15} = -338^\circ$  (C 0.6 CH<sub>3</sub>OH)。

### 实施例 7 (-)-黄皮酰胺的合成(一)I

将 2.95g 左旋化合物(5)\*加入到 200ml 甲醇中, 磁力搅拌溶解, 加入 1.52g NaBH<sub>4</sub>, 反应 3 小时; 滴加 1ml 2N 盐酸, 减压浓缩干, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 洗涤, 加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压浓缩干, 重结晶得 2.4g 化合物(I)\*。收率: 80.8%, mp: 160~161°C,  $[\alpha]_D^{15} = -144^\circ$  (C 0.2 CH<sub>3</sub>OH)。

### 实施例 8. 经消旋黄皮酰胺酮(±)5 的拆分制备(-)黄皮酰胺(-)I

将 3g (-)孟醇氧乙酸溶于 10g SOCl<sub>2</sub> 中, 加热回流 5 小时, 减压蒸出 SOCl<sub>2</sub>, 加入 5ml 甲苯, 再减压蒸去甲苯, 残余物为棕色油状物重 3.5g, 将其溶于 50ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 再投入 2g 消旋黄皮酰胺酮(±)5, 冰浴冷却, 加入 1ml 无水吡啶, 室温搅拌 4 小时。TLC 显示两点, 反应物依次用 2N 盐酸, 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液, 饱和 NaCl 水溶液洗, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 得棕色固体 5.4g, 经层离与重结晶, 得两种白色结晶(+7)\*和(-7)\*。

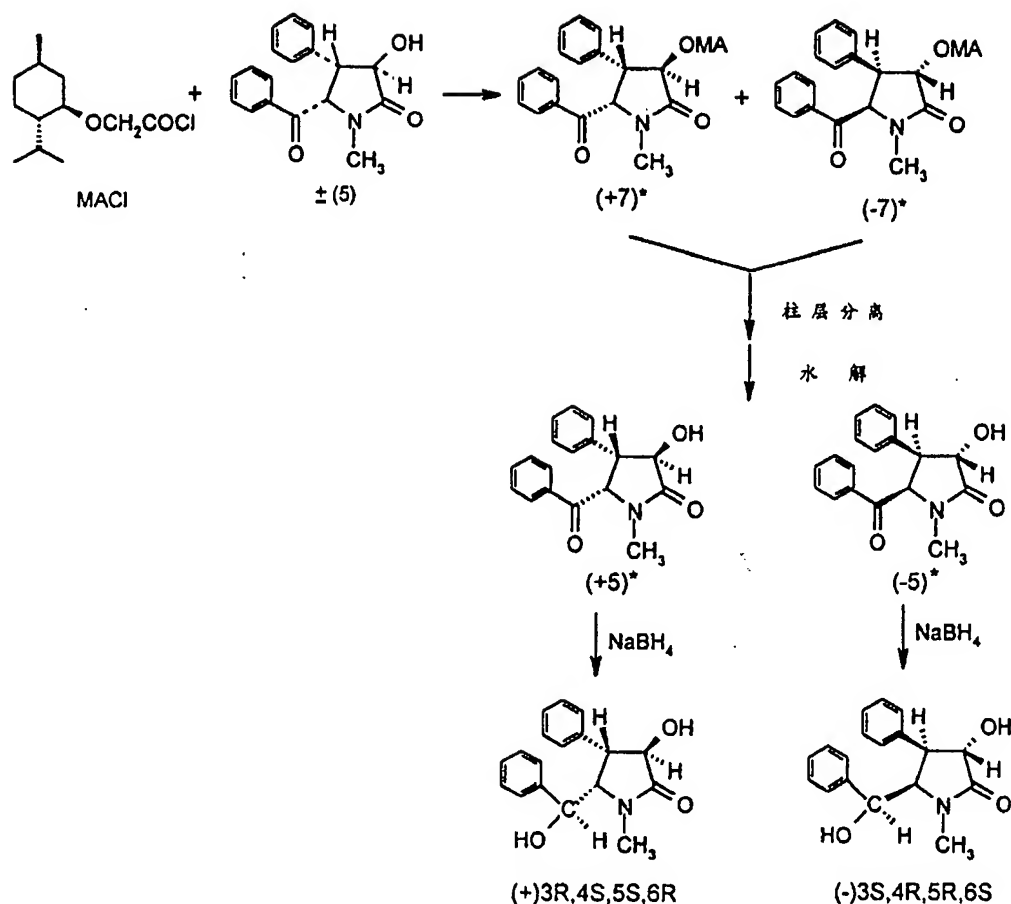
(+7)\*: 0.86g, 收率 24.8% (理论收率 50%), mp: 152~153°C,  $[\alpha]_D^{20} = +156^\circ$  (C 1.1 CHCl<sub>3</sub>);

(-7)\*: 1.06g, 收率 30.9% (理论收率 50%), mp: 177~178°C,  $[\alpha]_D^{18} = -249^\circ$  (C 0.21 CHCl<sub>3</sub>)。

分别以对甲苯磺酸作为催化剂在 30ml 甲醇中回流 2 小时, 蒸去甲醇, 有机层依次用稀盐酸, 稀碱水洗至中性, 由(+7)\*得(+)黄皮酰胺酮(+5)\*, 收率 82%, mp: 193~194°C,  $[\alpha]_D^{18} = +339^\circ$  (C 0.21 CH<sub>3</sub>OH)。由(-7)\*得(-)黄皮酰胺酮(-5)\*, 收率 88%, mp: 193~194°C,  $[\alpha]_D^{18} = -340^\circ$  (C 0.22 CH<sub>3</sub>OH)。

将(-)黄皮酰胺酮(-5)\* 0.59g, 按照实施例 7 相同的方法, 以 0.11g NaBH<sub>4</sub> 还原, 重结晶得 0.5g(-)黄皮酰胺(I)\*, 收率 83%, mp: 161~162°C,  $[\alpha]_D^{18} = -145^\circ$  (C 0.24 CH<sub>3</sub>OH)。

具体制备流程如下:



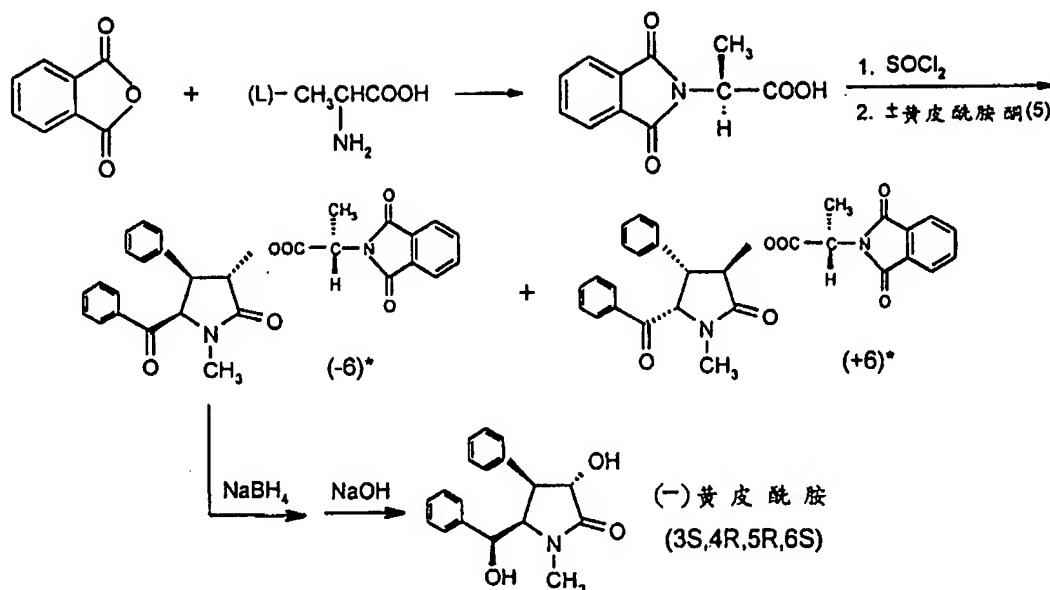
#### 实施例 9. 经消旋体黄皮酰胺酮(5)的拆分法制备(-)黄皮酰胺

将 3.56g (-)-S-邻苯二甲酰丙氨酸, 5g SOCl<sub>2</sub> 加入到 50ml 甲苯中, 加热回流 5 小时, 减压蒸去 SOCl<sub>2</sub>, 再加入 20ml 甲苯, 减压浓缩至干, 加入 100ml 干燥的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 用冰浴中冷却至 0℃ 以下, 加入 4g 消旋黄皮酰胺酮(5), 磁力搅拌, 滴加 1.6g 吡啶, 加毕室温搅拌 10 小时, 加入 30ml 水, 分取有机层, 用 30ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取, 合并有机相, 依次用 30ml 2N 盐酸, 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液, 饱和 NaCl 水溶液洗, 加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压浓缩干, 重结晶, 得 (-6)\*: 方晶 1.42g, 收率: 21.0% (理论量 50%), mp: 189~190℃, [α]<sub>D</sub><sup>15</sup> = -241° (C 0.5 CHCl<sub>3</sub>); (+6)\*: mp: 153~154℃, [α]<sub>D</sub><sup>15</sup> = +128.5° (C 2.1 CHCl<sub>3</sub>).

将 4.96g 方晶 (-6)\* 加入到 200ml 甲醇中, 磁力搅拌溶解, 加入 1.52g NaBH<sub>4</sub>, 室温反应 5 小时, 加入 1ml 2N HCl, 减压浓缩干, 重结晶, 得 (-)-黄皮酰胺 + (I) 2.38g, 收率 81%, mp: 161~163℃, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -144.4° (C 0.46 CH<sub>3</sub>OH).



其具体制备流程如下：



#### 实施例 10. 真菌酶拆分方法制备(+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*

将含有 3%蔗糖, 1%蛋白胨, 0.5%磷酸二氢钾, 0.5%的聚乙二醇, 1%的橄榄油 30ml 培养基置于 250ml 的烧瓶中, 在 120℃和一大气压下灭菌 30 分。冷却后, 向该培养基中接入一接种环的米曲霉 (*Aspergillus, sp*) 菌, 30℃下, 转速 220rpm, 培养 40 小时, 将菌体离心分离。并将菌体加入至 pH 值为 7 的 10ml 含有 150mg 的  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯的磷酸盐缓冲溶液中, 30℃下反应 72 小时。反应完毕, 加入 20ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 并以饱和的亚硫酸氢钠的水溶液洗涤, 饱和的碳酸氢钠溶液洗涤, 无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。浓缩得 66mg 油状物。该油状物经手性气相色谱分析 (G-TA 型手性柱, 柱长为 10 米, 氮气为载气, 流速为 2.5ml/min, 炉温为 105℃), 其 ee%值为 98%,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +180^\circ$  ( $c=1, \text{CHCl}_3$ )。

#### 实施例 11. 放线菌拆分方法制备(+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*

将含有 1%蔗糖, 2%蛋白胨, 0.3%磷酸二氢钾, 1%的聚乙二醇, 2%橄榄油, 30ml 的培养基置于 250ml 的烧瓶中, 在 120℃和一大气压下灭菌 30 分。冷却后, 向该培养基中接入一接种环的诺卡氏 (*Nocardia sp*) 菌, 30℃, 转速 250rpm,

培养 36 小时,将菌体离心分离。并将菌体加入至 pH 值为 7.5 的 10ml 含有 200mg 的消旋  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯(2)的磷酸盐缓冲溶液中, 30℃下反应 72 小时。反应完毕, 加入 20ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 并以饱和的亚硫酸氢钠的水溶液洗涤, 饱和的碳酸氢钠溶液洗涤, 无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。浓缩得 80mg 油状物。该油状物经手性气相色谱分析 (G-TA 型手性柱, 柱长为 10 米, 氮气为载气, 流速为 2.5ml/min, 炉温为 105℃), 其 ee%值为 98%,  $[\alpha]_D^{20} = +180^\circ$  (C=1  $\text{CHCl}_3$ )。

#### 实施例 12. 酵母酶拆分方法制备 (+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*

将含有 4%蔗糖, 2%蛋白胨, 1%磷酸二氢钾, 2%的聚乙二醇, 1%橄榄油, 30ml 的培养基置于 250ml 的烧瓶中, 在 120℃和一大气压下灭菌 30 分。冷却后, 向该培养基中接入一接种环的假丝酵母(*Candida sp*)菌, 30℃下转速 200rpm, 培养 40 小时, 将菌体离心分离。并将菌体加入至 pH 值为 8 的 30ml 含有 300mg 的消旋  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯(2)的磷酸盐缓冲溶液中, 30℃反应 72 小时。反应完毕, 加入 30ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 并以饱和的亚硫酸氢钠的水溶液洗涤, 饱和的碳酸氢钠溶液洗涤, 无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。浓缩得 120mg 油状物。该油状物经手性气相色谱分析 (G-TA 型手性柱, 柱长为 10 米, 氮气为载气, 流速为 2.5ml/min, 炉温为 105℃), 其 de%值为 98%,  $[\alpha]_D^{20} = +180^\circ$  (c=1,  $\text{CHCl}_3$ )。

#### 实施例 13 细菌酶拆分方法制备 (+)-2S,3R-3-苯基缩水甘油酸甲酯(2)\*

将含有 2.5%柠檬酸钠, 1%大豆蛋白胨, 0.5%磷酸二氢钾, 2.5%的聚乙二醇, 1%橄榄油 30ml 的培养基置于 250ml 的烧瓶中, 在 120℃和一大气压下灭菌 30 分。冷却后, 向该培养基中接入一接种环的无色杆菌 (*Achromobacter.sp*), 40℃下转速 200rpm, 培养 40 小时, 将菌体离心分离。并将菌体加入至 pH 值为 7 的 10ml 含有 150mg 的消旋  $\beta$ -苯基缩水甘油酸甲酯(2)的磷酸盐缓冲溶液中, 30℃反应 72 小时。反应完毕, 加入 20ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 并以饱和的亚硫酸氢钠的水溶液洗涤, 饱和的碳酸氢钠溶液洗涤, 无水  $\text{MgSO}_4$  干燥。浓缩得 66mg 油状物。该油状物经手性气相色谱分析 (G-TA 型手性柱, 柱

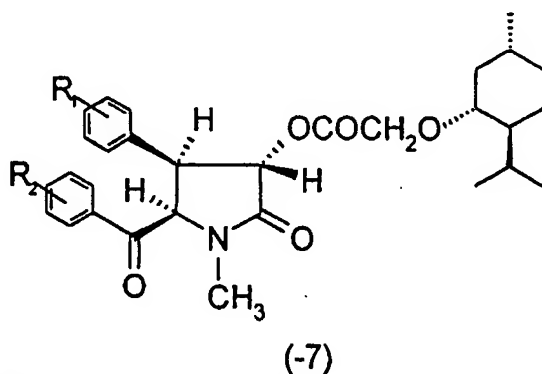
长为 10 米, 氮气为载气, 流速为 2.5ml/min, 炉温为 105℃), 其 de% 值为 99%,  
 $[\alpha]_D^{20}=+181^\circ$  (C=1 CHCl<sub>3</sub>)。

#### 实施例 14 细菌酶拆分方法制备 (+)-2S,3R-3- 苯基缩水甘油酸甲酯 (2) \*

将含有 2% 乳酸, 1.5% 硫酸胺, 0.5% 磷酸二氢钾, 0.5% 的聚乙二醇, 0.1% 橄榄油 30ml 的培养基置于 250ml 的烧瓶中, 在 120℃ 和一大气压下灭菌 30 分。冷却后, 向该培养基中接入一接种环的芽孢杆菌 (*Bacillus .sp*), 50℃ 下转速 220rpm, 培养 40 小时, 将菌体离心分离。并将菌体加入至 pH 值为 10 的 10ml 含有 150mg 的消旋 β- 苯基缩水甘油酸甲酯 (2) 的磷酸盐缓冲溶液中, 50℃ 反应 72 小时。反应完毕, 加入 20ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 并以饱和的亚硫酸氢钠的水溶液洗涤, 饱和的碳酸氢钠溶液洗涤, 无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥。浓缩得 66mg 油状物。该油状物经手性气相色谱分析 (G-TA 型手性柱, 柱长为 10 米, 氮气为载气, 流速为 2.5ml/min, 炉温为 105℃), 其 de% 值为 98%,  
 $[\alpha]_D^{20}=+181^\circ$  (C=1 CHCl<sub>3</sub>)。

#### 实施例 13 X-光晶体衍射法测定 (-)- 黄皮酰胺的绝对构型

为了确定 (-)- 黄皮酰胺的绝对构型, 采用实施例 9 中的化合物 (-7) 的单晶:

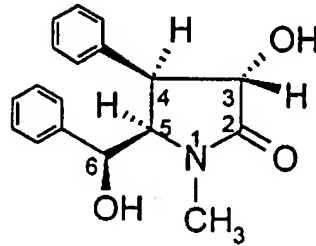
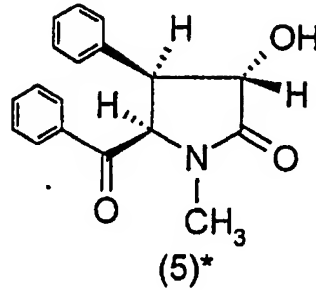


由于 (-)- 盖氧乙酸的绝对构型是已知的, 根据化合物 (-7) 的单晶 X-光衍射测定结果, 表明化合物 (5) \* 的绝对构型如下结构式所示。

将 (-) 7 化合物水解, 经硼氢化钠还原得 (-)- 黄皮酰胺 (-) I, 根据由 Sharpless 还原方法所得黄皮酰胺旋光为 (+), 构型为 3R\*, 4S\*, 5S\*, 6R\* (+) I, 且其绝对值与所得的 (-) I 相同, 符号相反, 熔点也一致, 由此 C<sub>6</sub> 应有 6S 的

构型，即(-)-黄皮酰胺(+)I 应具有 3S,4R,5R,6S 的构型。

I



经实验得出(-)黄皮酰胺的促智活性至少是(±)黄皮酰胺的5倍，(+)黄皮酰胺就本发明的作用几乎没有生物活性；(-)黄皮酰胺不仅在行为学上，也在电生理方面证明它易化学习记忆和增强神经可塑性的作用；(-)黄皮酰胺不但有很强的促智作用，并具有潜在的防治老年痴呆作用，它表现在抗神经细胞凋亡以及抑制 Tau 蛋白过磷酸化；除了已经从生化学，分子生物学和形态结构等方面阐明(-)黄皮酰胺的促智作用机制以外，特别是在形态结构方面证明它可以刺激海马苔状神经末梢的发芽；经对(-)(+)黄皮酰胺的研究，证明其代谢产物也有生物活性。

#### 实验例 1 (-)黄皮酰胺增强大鼠海马齿状回突触传递活动的机制

采用麻醉大鼠，将刺激电极埋藏于内嗅区前穿质通路，记录电极埋藏于海马齿状回(DG)颗粒细胞层，以群峰电位(PS)作为 DG 颗粒细胞群兴奋性的指标，LTP 是由 10 串 200Hz 的高频电刺激所诱导，每串刺激由 5 个波宽 0.2ms 的

方波刺激组成, (-)、(+)黄皮酰胺和相应浓度的助溶剂 DMSO 都是通过植入侧脑室的套管给予, 记录 30min 的 PS 代表给药前的基础突触传递水平, 然后于 5 分钟内将 5  $\mu$ l 的相应药物或助溶剂缓慢注入侧脑室。

1. 研究证明, 在麻醉大鼠 DG 部位用 200Hz 高频刺激诱导出一种 NMDA 受体和 VDCC 依赖性的 LTP。(-)黄皮酰胺增强麻醉大鼠海马 DG 突触传递过程是 VDCC 依赖性的而与 NMDA 受体无关, 高频刺激诱导的 LTP 和(-)黄皮酰胺增强的突触传递活动都伴有海马依赖性的蛋白磷酸酶 Calcineurin 和 Calpain 活性的提高, (参见下表 1 和表 2)提示参与 LTP 和(-)黄皮酰胺对突触传递活动增强作用的不仅是蛋白激酶, 而且有蛋白磷酸酶, 说明蛋白磷酸化和脱磷酸化过程都有所增强, 可能是由这两个过程最后相互协调和互为补充的结果决定突触水平的高低。

表 1. 大鼠皮层和海马组织的 Calcineurin 活性

组 别	Calcineurin 活性( $\mu$ mol Pi/hr/ $\mu$ g 蛋白)	
	脑皮层	海马
对照	8.3 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.6
AP5	7.9 $\pm$ 0.7	8.1 $\pm$ 0.7
尼莫地平	8.4 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 0.8
高频电刺激 (HFS)	9.2 $\pm$ 1.1	8.5 $\pm$ 0.7
APS+HFS	8.8 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 0.5*
尼莫地平+HFS	7.7 $\pm$ 1.4	9.8 $\pm$ 0.4*
APS+尼莫地平+HFS	8.0 $\pm$ 0.9	7.9 $\pm$ 0.7
(-) 黄皮酰胺	11.2 $\pm$ 0.9*	10.4 $\pm$ 0.5*
(-) 黄皮酰胺+APS	11.6 $\pm$ 1.4*	10.1 $\pm$ 0.8*
(-) 黄皮酰胺+尼莫地平	9.1 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 0.6

\*与对照组比较,  $P < 0.05$

表 2. 大鼠皮层和海马组织的 Calpain 活性

组 别	Calpain( $\Delta$ A595nm/hr/mg 蛋白)	
	脑皮层	海马

对照	1.5±0.2	7.8±0.6
APS	1.6±0.4	1.6±0.6
尼莫地平	1.7±0.3	1.8±0.5
HFS	1.8±0.7	4.3±0.7**
APS+HFS	1.7±0.4	2.9±0.8*#
尼莫地平+HFS	1.8±0.5	2.6±0.7*#
APS+尼莫地平+HFS	1.7±0.4	1.8±0.6
(-) 黄皮酰胺	2.6±0.5*	2.7±0.8*
APS + (-) 黄皮酰胺	2.7±0.6*	2.6±0.7*
尼莫地平+ (-) 黄皮酰胺	1.6±0.6	1.9±0.6

\*及\*\*表示与对照组相比,  $P<0.05$  及  $P<0.01$  #与 HFS 组相比  $P<0.05$ 。

2. 研究证明, 正常成年大鼠海马 CA3 区和 DG 存在少量苔状纤维末梢出芽现象。(-) 黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量依赖性地促进这两个海马区域的苔状纤维末梢的出芽, 而同剂量(+)黄皮酰胺却对其没有明显的影响, 提示(-)、(+) 黄皮酰胺这种作用的明显差异可能是其长期给药对海马突触传递不同影响的形态学基础 (结果列于图 3、图 4)

3. BDNF (脑源性神经营养因子) 大量地在正常大鼠皮层神经元和海马颗粒细胞和锥体细胞内表达, (-) 黄皮酰胺 ( $8, 40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量依赖性增加 BDNF 在这两个区域的表达, (+) 黄皮酰胺 ( $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 对其也有轻度增加作用, 提示 (-) (+) 黄皮酰胺长期给药对海马突触传递活动的不同影响可能与其对 BDNF 蛋白表达的作用差异有关。结果见图 5:

4. 谷氨酸受体在 (-) 黄皮酰胺致 LTP 中的作用。兴奋性神经递质谷氨酸在中枢神经系统中含量丰富, 它从突触前释放, 激活突触后多种谷氨酸受体, 在 LTP 中占有重要地位, G 蛋白偶联性受体 mGluR 不直接调节电信号, 而是激活多种第二信使级联反应。我们观察了 mGluR 拮抗剂 (±) MCPG 对 (-) 黄皮酰胺诱发在体海马齿状回 LTP 的影响, 结果表明, (±) MCPG ( $10\mu\text{mol, icv}$ ) 抑制 HFS 和 (-) 黄皮酰胺诱导的 LTP, 在给予 HFS 和 (-) 黄皮酰胺后 15min 侧脑室注射 (±) MCPG 可以逆转已经建立的 LTP, 提示 MCPG 敏感的 mGluR 受

体是(-)黄皮酰胺诱导和维持 LTP 所必须的,(-)黄皮酰胺通过 mGluR 受体引起突触传递功能增强。

### 实验例 2 (-) 和 (+) 黄皮酰胺对 $\beta$ -A 致记忆障碍的改善作用

老年斑是老年性痴呆症患者的主要神经病理特征。其核心成分是一种由 40-42 个氨基酸组成的多肽,这种被称为  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -A)的多肽已被大量的研究证实其具有神经毒性作用。 $\beta$ -A 结构中一个由 11 个氨基酸(25-35)组成的片断  $\beta$ -A(25-35)具有与  $\beta$ -A 相似的神经毒性作用和自我凝聚能力,跟  $\beta$ -A 一样,凝聚态  $\beta$ -A(25-35)的神经毒性较其溶解态强,利用向大鼠侧脑室注射凝聚态  $\beta$ -A(25-35)成功地造成了动物在 Morris 水迷宫中的记忆障碍模型。

脑室内注射 15nmol  $\beta$ -A(25-35) 后第 15 天开始采用 Morris 水迷宫训练测试大鼠的空间学习记忆能力,每天训练 4 次,每次 3min。结果以动物找到平台所需的时间即潜伏期,朝向错误角度(动物躯体长轴所指方向与入水点到平台间连线的夹角)和动物寻找平台所采用的策略来表示。

训练的第 2 天开始, $\beta$ -A(25-35)模型组的潜伏期明显比对照组长( $F=3.04, P<0.05$ )至第 5 天,差别最显著( $F=13.7, P<0.01$ )。从第 3 天开始,(-)黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组和  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组的潜伏期比  $\beta$ -A(25-35)模型组明显缩短( $F=2.68, P<0.05$  和  $F=2.73, P<0.05$ )。 (+)黄皮酰胺 8 和  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组和脑复康  $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组训练各天的潜伏期与  $\beta$ -A(25-35)模型组没有显著差异。各组动物的错误朝向角度随着训练次数的增加逐渐减小,从第 3 天开始模型组的错误朝向角度明显大于对照组,(-)黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组明显小于模型组。同剂量的 (+)黄皮酰胺  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  脑复康组与模型组间无显著性差异。(见表 3)

表 3.  $\beta$ -AP(25-35) 对 Morris 水迷宫训练中朝向错误角度的影响及 (-)、 (+)黄皮酰胺的作用。朝向错误角度以  $\text{MEAN} \pm \text{S.D.}$  表示。

组别	训练天数				
	1	2	3	4	5

A	93.6±34.6	76.8±29.8	47.3±15.1	29.6±10.7	15.4±20.4
B	106.3±29.8	98.7±30.4	73.5±20.3*	60.6±23.8*	46.7±19.4*
C	89.7±29.4	72.3±19.8	46.5±21.2#	30.4±14.8#	17.6±9.5#
D	101.5±24.3	83.5±21.8	51.2±18.7#	28.4±13.2#	20.7±8.7#
E	99.4±31.7	93.5±29.6	82.1±26.7	70.2±21.5	59.2±18.3
F	112.4±32.8	102.5±28.7	94.2±22.5	83.1±26.5	65.4±20.8
G	92.5±28.9	87.3±24.2	74.6±23.7	62.5±19.6	44.5±14.3

\*P<0.05vs 对照组; #P<0.05vs 模型组。A: 对照组 B: 模型组 C: 模型 (-) 黄皮酰胺 8mg/kg 治疗组 D: 模型 (-) 黄皮酰胺 40mg/kg 治疗组 E: 模型 (+) 黄皮酰胺 8mg/kg 治疗组 F: 模型 (+) 黄皮酰胺 40mg/kg 治疗组 G: 模型脑复康 400mg/kg 治疗组。

本实验中大鼠四种典型的搜索站台的方式: 随机式, 边缘式, 趋向式和直线式都观察到了。在训练开始时各组动物都主要以边缘式和随机式策略寻找站台, 随着训练次数的增加, 这两种搜索策略的出现率逐渐下降。从第三天开始, 正常对照组和 (-) 黄皮酰胺治疗组这种下降的速度和程度较其它组快。同时, 趋向式和直线式的出现逐渐增加。其结果见说明书附图 2。

### 实验例 3 (-) 黄皮酰胺对 Bax cDNA 高表达的 PC12 细胞凋亡的抑制作用

#### 1、首次建成 Bax $\alpha$ 稳定表达的 PC12 细胞系

首先用限制性内切酶去除了 Bax  $\alpha$  cDNA 3' 末端加 Poly A 信号序列及部分其它序列, 构建了中间载体 Pbluescript SK-Bax  $\alpha$  (PA) 然后用内切酶从中间载体将 Bax  $\alpha$  cDNA 切出, 以单一方向与真核表达载体 PcDNA3 相连接获得 PcDNA3 Bax  $\alpha$  重组质粒。序列重组的 Bax  $\alpha$  cDNA 含有 -50bp 的 5' 非翻译末端 (5' -UTR), 576bp 的开放读码框架 (ORF) 以及 137bp 的 3' 非翻译末端 (3' -UTR)。用 lipofectamine 脂质体转染法将 pcDNA3-Bax  $\alpha$  转入 PC12 细胞, 用 G-418 选择抗性细胞克隆。Western 印迹法和免疫组织化学法都显示 PC-12 细胞系内有 Bax  $\alpha$  蛋白高水平的表达, 故本研究成功地首次建立了 Bax  $\alpha$  稳定表达的 PC12 细胞系。

#### 2、Bax $\alpha$ 高表达 PC12 细胞系凋亡模型的建立及(一)黄皮酰胺的抗细胞凋亡



作用

原位末端标记 (TUNEL) 和流式细胞仪观察表明 6-羟基多巴胺 (6-OHDA)  $100 \mu\text{mol/L}$  可以诱导 Bax  $\alpha$  高表达 PC-12 细胞系的凋亡损伤, 与转空载细胞相比较凋亡的比例明显上升 (49.96% vs 32.9%), 说明 Bax  $\alpha$  在凋亡过程中起重要作用, 给予 (一) 黄皮酰胺  $10^{-7} \sim 10^{-5} \text{mol/L}$  后可使细胞凋亡比例从 49.96% 分别下降到 36.23%, 28.1% 和 9.5%。

### 3、(-) 黄皮酰胺抗细胞凋亡作用机制的研究

(1) Bax  $\alpha$  高表达 PC12 细胞经 6-OHDA 诱导后 24 小时, 细胞内 Bcl-2 抗细胞凋亡基因的水平有一定程度下降, 给予 (一) 黄皮酰胺  $10^{-7}$  和  $10^{-6} \text{mol/L}$  后, 可使 Bcl-2 蛋白的水平明显升高。

(2) Bax  $\alpha$  高表达 PC12 细胞经 6-OHDA 作用后 24 小时, 线粒体内 GSH 的含量明显降低 ( $9.84 \pm 1.20$  vs  $14.98 \pm 1.18 \text{n mol/mg pro}$ ), MDA 的含量明显升高 ( $2.46 \pm 0.19$  vs  $2.01 \pm 0.12 \text{n mol/mg pro}$ ) 给予 (一) 黄皮酰胺  $10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} \text{mol/L}$  后可使线粒体内 GSH 的含量显著升高 ( $12.29 \pm 0.99$ ,  $15.10 \pm 0.95$ ,  $17.78 \pm 1.04 \text{n mol/mg pro}$ ) MDA 的含量明显下降 ( $1.76 \pm 0.17$ ,  $1.54 \pm 0.13$ ,  $1.33 \pm 0.11 \text{n mol/mg}$

Bax  $\alpha$  高表达 PC12 细胞与转空载细胞相比较具有较高的线粒体膜电位(95.08 VS 83.03)。经 6-OHDA 诱导后 12 小时, Bax  $\alpha$  高表达 PC12 细胞的线粒体膜电位明显降低(95.08 vs 24.6) 给予(-)黄皮酰胺  $10^{-7}$  和  $10^{-6}$ mol/L 后可以使线粒体膜电位明显升高( $30.7 \pm 3.3, 56.0 \pm 5.0$ )。另外, Bax  $\alpha$  高表达 PC12 细胞经 6-OHDA 诱导后 12 小时, 线粒体电子传递链复合酶 I 的活性显著降低( $1.44 \pm 0.16$  vs  $1.68 \pm 0.14$   $\mu$ mol/mg pro/min), 复合酶IV的活性也显著降低( $0.09 \pm 0.019$  vs  $0.15 \pm 0.022$   $\mu$ mol/mg pro/min)。给予(-)黄皮酰胺  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ mol/L 后, 可使线粒体电子传递链复合酶 I 活性升高( $1.57 \pm 0.12, 1.98 \pm 0.05, 2.16 \pm 0.2$   $\mu$ mol/mg pro/min)。以及使复合酶IV活性升高( $0.12 \pm 0.015, 0.15 \pm 0.02, 0.18 \pm 0.01$   $\mu$ mol/mg pro/min)。

#### (4) (-)黄皮酰胺对体外分离线粒体细胞色素 C 释放的影响

细胞在受到凋亡信号的刺激后, 细胞色素 C 进入到细胞浆内激活死亡程序, 本研究首先用固相金属离子纯化法分离得到 Bax  $\alpha$  蛋白, 当将其加入到分离的线粒体后, 可使线粒体细胞色素 C 含量减少( $74.43 \pm 5.69$   $\mu$ g/mg pro vs  $50.2 \pm 30.65$   $\mu$ g/mg pro), (-)黄皮酰胺  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ mol/L 可使细胞色素 C 释放分别降低为  $58.73 \pm 3.77, 61.7 \pm 5.3$  和  $67.95 \pm 7.6$   $\mu$ g/mg pro。

#### 实验例 4 (±)、(-)、(+) 黄皮酰胺改善记忆作用的比较

本发明采用一次性回避条件反射跳台法和避暗法以多次学习的水迷宫法观察 (±)、(-)、(+) 黄皮酰胺对改善记忆的作用进行了比较性试验。

跳台法和避暗法系于实验前口服药物一次。水迷宫法共实验 5 天, 每天训练前腹腔注射药物一次, 连续 5 天, 结果以潜伏期、错误次数表示。

表 4 为脑复康和 (-) 黄皮酰胺对跳台法和避暗法因注射樟柳碱引起记忆获得障碍的作用。

表 4

药物	剂量 mg/kg	错误次数	错误次数	潜伏期 (X±g)	潜伏期 (X±g)
		避暗法	跳台法	避暗法	跳台法
0.9%Nacl		12.7±4.6	0.9±1.0	24.4±59	184±105
脑复康	500	4.1±3.2***	0.7±0.5	107±110**	180±110
(-)-黄皮酰胺	5	5.7±4.7***	0.5±0.5	47.9±90**	186±129
	10	6.5±5.0***	0.2±0.4**	59.4±91**	296±97**
	50	7.1±3.6***	0.2±0.4**	17.1±12.4	265±91**

N=10 x±SD \*\*<0.05 \*\*\*P<0.01 VS 0.9% Nacl(樟柳碱)

表 5 为脑复康和 (-)、(±) 黄皮酰胺对水迷宫的学习记忆潜伏期和记忆过程的影响。

表 5

药物	剂量 mg/kg	第二天	第三天	第四天
		达到平台的潜伏期 (秒)	达到平台的潜伏期 (秒)	
0.9%Nacl		32.4±29.2	25.8±18.4	26.1±38.4
脑复康	500	32.2±22.6	18.6±9.9**	16.7±16.3**
(-)-黄皮酰胺	10	28.7±35.2	17.4±10.9**	12.1±6.9**
(±)-黄皮酰胺	10	35.8±35.2	23.9±22.6	17.1±14.3
(±)-黄皮酰胺	100	36.6±37.0	25.7±13.8	14.6±10.4**

N=10, x±SD \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01 VS 0.9% Nacl

表 6 为脑复康、(-)、(±) 黄皮酰胺对水迷宫实验中因注射樟柳碱 (10 mg/kg) 引起记忆获得障碍的作用。

表 6

药物	N	剂量 (mg/kg)	错误次数
樟柳碱	10		15.9±11.3
脑复康	9	500	23.5±25.0
(-) 黄皮酰胺	10	10	9.4±5.9**
(±) 黄皮酰胺	8	10	16.6±23.9
(±) 黄皮酰胺	8	100	9.11±3.8**

\*\*P<0.05 VS 樟柳碱组

表 7 为 (-)、(+) 黄皮酰胺对避暗实验中樟柳碱引起记忆获得障碍的作用

表 7

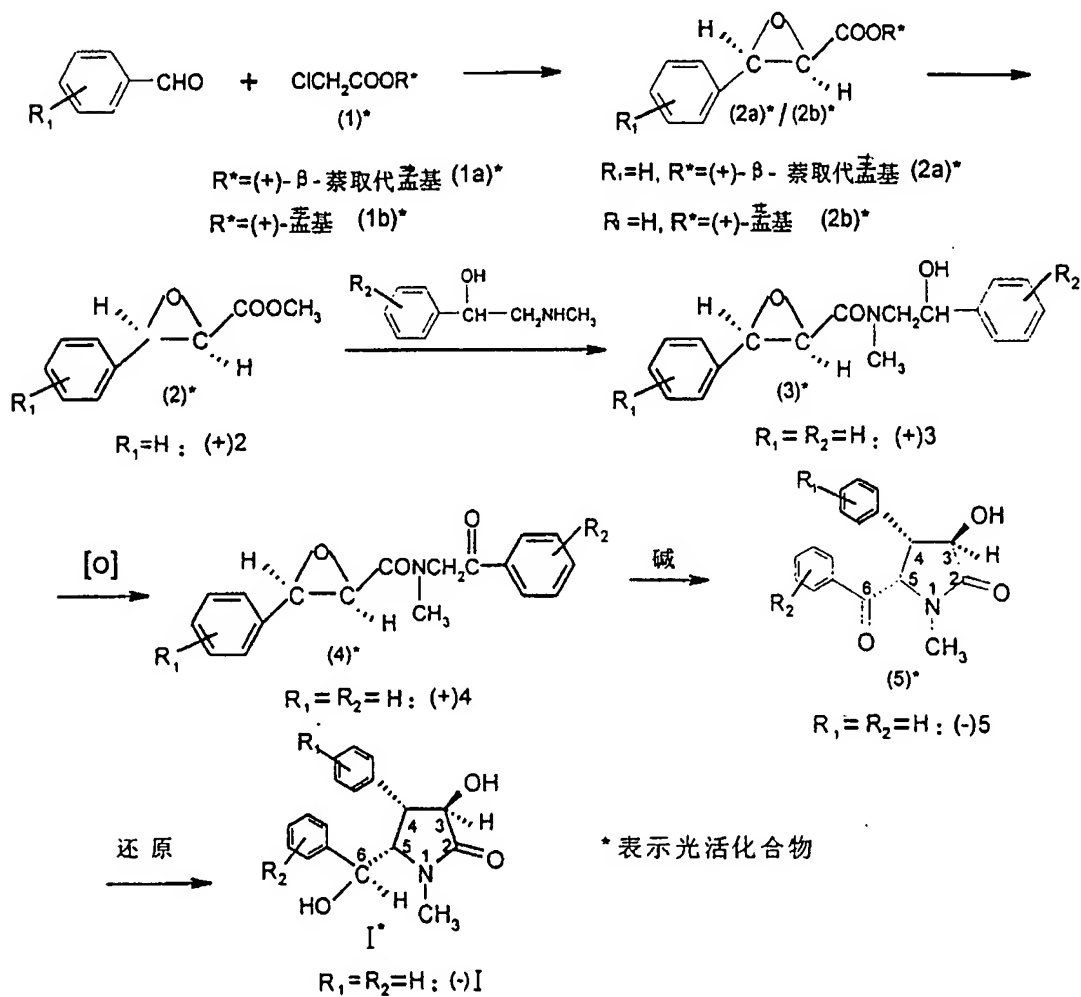
药物	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (秒)	错误次数
0.9%NaCl		152.1±64.2	2.0±3.8
樟柳碱	10	35.8±76.4**	14.1±8.9**
(+) 黄皮酰胺	10	138.2±86.7**	6.7±11.0*
(-) 黄皮酰胺	50	140.6±96.4**	5.4±4.1**
(±) 黄皮酰胺	10	43.0±65.8	11.3±21.5
(±) 黄皮酰胺	50	79.9±63.6	14.4±12.3

\*P<0.05 \*\*P<0.01 VS 樟柳碱组 \*\*P<0.01 VS 0.9%NaCl 组

(-)、(+) 黄皮酰胺于训练前 30 分钟灌喂给药。樟柳碱组于训练前 10 分钟腹腔注射给药。

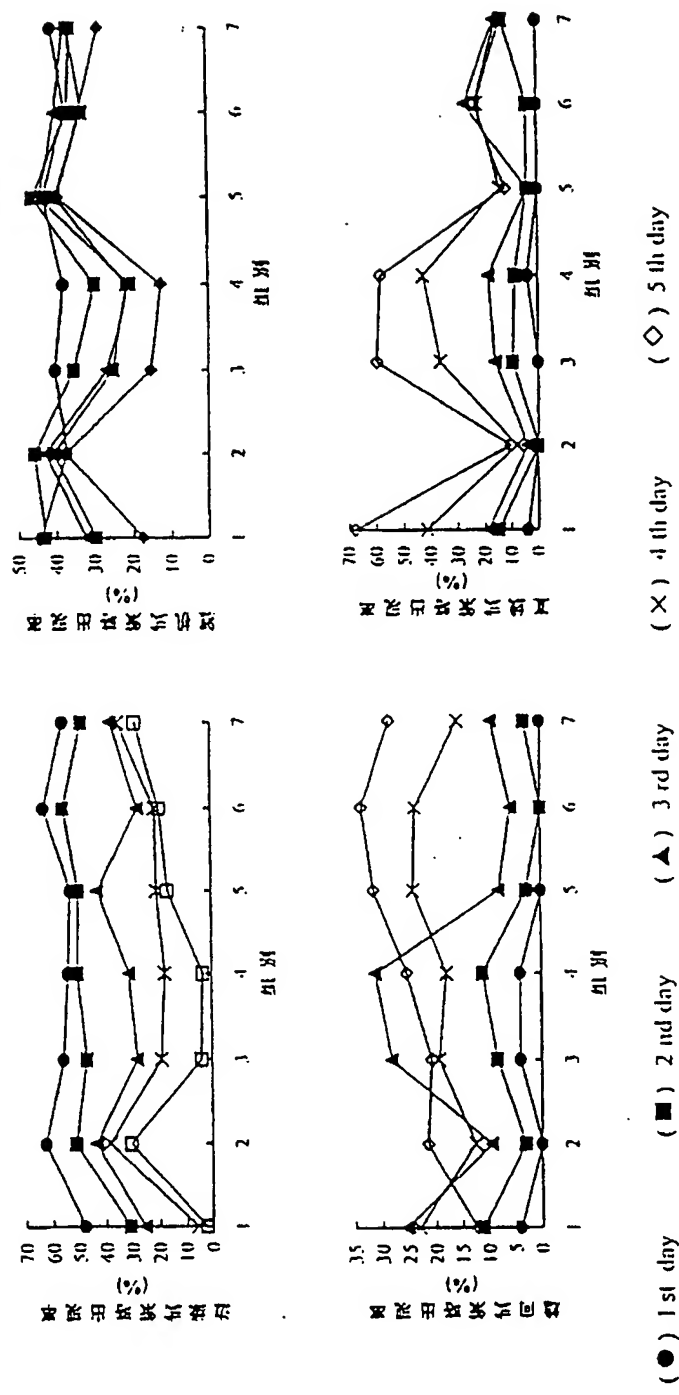
00.09.28

# 说明书附图



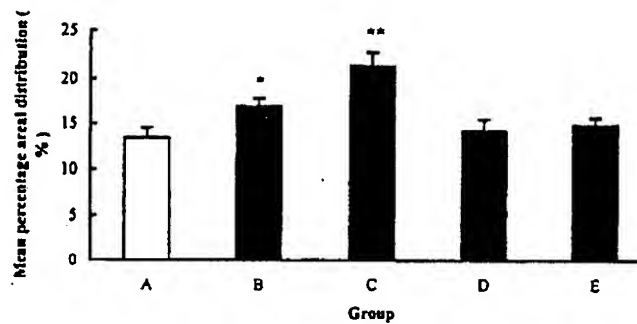
附图 1

00.09.28

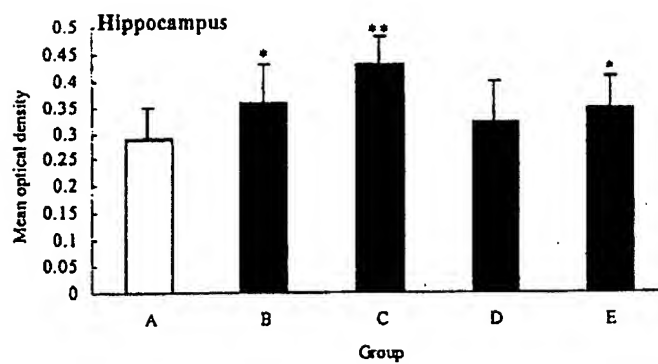


附图 2

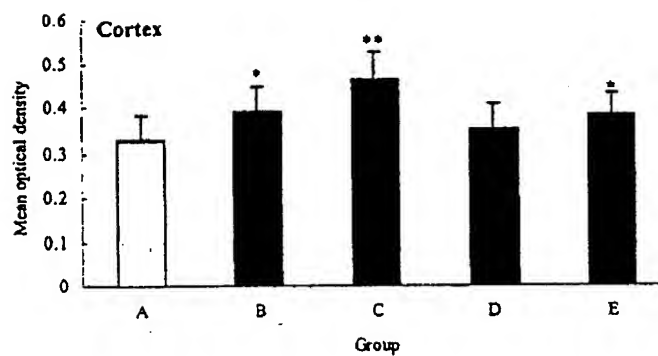
01-03-05



附图 3



附图 4



附图 5